

PRODUCTION OF BACTERIAL CELLULOSE

Veröffentlichungsnr. (Sek.) JP7039386
Veröffentlichungsdatum : 1995-02-10
Erfinder : MATSUOKA MASANOBU; others: 03
Anmelder :: BIO POLYMER RES:KK
Originalnummer : JP7039386
Anmeldenummer : JP19930191467 19930802
Prioritätsnummer :
Klassifikation IPK : C12P19/04 ; C08B37/00
Klassifikation EK :
Korrespondierende Patentschriften JP2766165B2

Zusammenfassung

PURPOSE: To industrially and advantageously obtain the subject edible compound by culturing a microorganism, belonging to the genus *Acetobacter* and having the ability to produce a cellulosic substance in a culture medium containing a carboxylic acid (salt) which is a factor in promoting the production of the cellulose and then collecting the resultant product,

CONSTITUTION: This method for producing a bacterial cellulose is to inoculate a microorganism, belonging to the genus *Acetobacter* and having the ability to produce a cellulosic substance (e.g. *Acetobacter xylinum* ATCC23768) in a culture medium containing a carboxylic acid (e.g. lactic acid) or a salt thereof as a factor in promoting the production of cellulose added thereto, carry out the stationary culture in a low- temperature incubator at 28 deg.C for 3 days, then filter the culture solution through a gauze, subsequently centrifuge the filtrate, separate the microbial cell, add a sterilized physiological saline solution to the separated microbial cell, provide a seed microbial solution, inoculate the prepared seed microbial solution into the same culture medium as that used in culturing the seed, perform the main culture at 28 deg.C for 4 days while shaking the culture medium and then collect the cellulose and cellulosic substance, produced and accumulated in the culture medium. This bacterial cellulose is useful for retaining the viscosity of a food, a cosmetic, a coating, etc., and usable as a food additive, an emulsion stabilizer, etc.

Daten aus der esp@cenet Datenbank - - 12

11

は、乳酸無添加の場合でもセルロース産生が著しく向上するが、乳酸添加により無添加の場合の約1.5倍～約2.5倍にセルロース蓄積量がさらに向上することを示している。

【0052】

【発明の効果】本発明方法による発酵法を利用したセル

12

ロース生産において、カルボン酸又はその塩を培地に微量もしくは少量添加するだけでセルロース生産性が従来法と比べて著しく向上する。このことは、本方法がセルロースを効率よくかつ安価に製造できることを示している。

【手続補正書】

【提出日】平成5年8月18日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正内容】

【0009】本発明において使用される微生物はアセトバクター属に属し、セルロース性物質を産生する微生物であればどのようなものでもよい。例えば、アセトバクター・スピーシーズ (*Acetobacter* sp.) BPR2001株 (FERM P-13466)、アセトバクター・キシリナム (*Acetobacter xylinum*) ATCC23768、アセトバクター・キシリナム ATCC23769、アセトバクター・キシリナム ATCC10821などが挙げられる。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正内容】

【0010】本発明方法で使用される特定のカルボン酸又はその塩は、セルロース生成促進因子として該微生物のセルロース生合成系に作用して、セルロースの生産性を著しく向上させる。すなわち、後述する実施例に示すように、培地中のセルロース蓄積量はカルボン酸無添加

の場合と比較して約1.5倍～約12倍に達する。本明細書中「セルロース生成促進因子としてのカルボン酸又はその塩」は、カルボン酸又はその塩を添加しない場合と比較してセルロース蓄積量を増加させる、好ましくは約1.5倍以上増加させるカルボン酸又は塩を指す。本発明で使用し得るカルボン酸は飽和又は不飽和カルボン酸のいずれでもよく、例えば、飽和カルボン酸として酢酸、乳酸、ピルビン酸、コハク酸、リンゴ酸、グルコン酸、グルクロン酸などが挙げられ、また、不飽和カルボン酸としてフマル酸、マレイン酸、アクリル酸、安息香酸などが挙げられる。これらカルボン酸は、炭素数、カルボキシル基数に特に制限はないが、水溶性であることが望ましい。好ましいカルボン酸は乳酸、ピルビン酸、酢酸である。カルボン酸を塩として使用するときは、特に制限されないが、通常アルカリ金属又はアルカリ土類金属の塩を使用し得る。これらのカルボン酸又はその塩は単独で使用してもよいし、また2種以上組み合わせで使用することもできる。また、カルボン酸又はその塩の添加量は特に制限されないが、好ましくは1mmol～200mmol/Lである。本発明においては、カルボン酸又はその塩は主要炭素源として培地に添加するよりはむしろ、セルロース生成促進因子として微量もしくは少量添加するだけでセルロース生産性を顕著に向上させることができる。

19. Japanisches Patentamt (JP)
12. Ungeprüfte Veröffentlichung der Patentanmeldung (A)
11. Veröffentlichungsnummer: 7-39386
43. Veröffentlichungsdatum: 10. 02. 1995
51. Int. Cl.⁶: C12P 19/04, C08B 37/00 // (C12P 19/04, C12R 1:02)
Prüfungsantrag nicht gestellt
21. Patentanmeldenummer: 5-191467
22. Anmeldedatum: 02. 08. 1993
71. Anmelder: 593041273
Biopolymer Research K.K., Kanagawa
72. Erfinder: Masanobu MATSUOKA, Kanagawa
72. Erfinder: Kiyoshi TAKEMURA, Kanagawa
72. Erfinder: Takayasu TSUCHIDA, Kanagawa
72. Erfinder: Fumio YOSHINAGA, Kanagawa
54. Titel der Erfindung:

Verfahren zur Herstellung von Bakterienzellulose

57. Zusammenfassung:

Aufbau: Verfahren zur Herstellung von Zellulose, wobei Mikroorganismen, die zur Familie Acetobacter gehören und die Fähigkeit zur Produktion von zelluloseartigen Substanzen haben, in Kulturmedium kultiviert werden, dem Carbonsäuren oder deren Salze als das Zellulosewachstum fördernde Faktoren zugesetzt sind, im Kulturmedium die Zellulose und die zelluloseartigen Substanzen wachsen gelassen und angesammelt werden, und diese Substanzen gewonnen werden.

Wirkung: Die Zelluloseproduktion kann deutlich gesteigert werden.

PATENTANSPRÜCHE:

1. Verfahren zur Herstellung von Zellulose, wobei Mikroorganismen, die zur Familie Acetobacter gehören und die Fähigkeit zur Produktion von zelluloseartigen Substanzen haben, in Kulturmedium kultiviert werden, dem Carbonsäuren oder deren Salze als das Zellulosewachstum fördernde Faktoren zugesetzt sind, im Kulturmedium die Zellulose und die zelluloseartigen Substanzen wachsen gelassen und angesammelt werden, und diese Substanzen gewonnen werden.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Carbonsäuren oder deren Salze Milchsäure, Brenztraubensäure oder Essigsäure oder deren Salze sind.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass dem Kulturmedium 1 bis 200 mMol/l Carbonsäuren oder deren Salze zugesetzt werden.

4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Kultur ruht, geschüttelt wird oder durch Gasdurchblasen gerührt wird.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG:

[0001] Gebiet der gewerblichen Anwendung:

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung von zelluloseartigen Substanzen, die von Mikroorganismen produziert werden, die zur Familie Acetobacter gehören und die Fähigkeit haben, zelluloseartige Substanzen zu produzieren. Genauer gesagt bezieht sie sich auf die Produktion von zelluloseartigen Substanzen mit Hilfe von Mikroorganismen in einem Kulturmedium, das als das Zellulosewachstum fördernde Faktoren bestimmte organische Säuren enthält.

[0002] Da diese zelluloseartigen Substanzen essbar sind, auf dem Gebiet der Lebensmittel verwendet werden und außerdem in Wasser o.ä. hervorragend dispergieren, sind sie für die Aufrechterhaltung der Viskosität von Lebensmitteln, Kosmetika oder Lacken etc., zur Verstärkung von Nährböden für Lebensmittel-Ausgangsstoffe, zur Beibehaltung des Wasseranteils, zur Steigerung der Stabilität von Lebensmitteln, als Zusatzstoff mit wenig Kalorien oder als Hilfsmittel zur Stabilisierung von Emulsionen industriell von hohem Nutzwert.

[0003] Weiters gibt es für die Disaggregationsprodukte zelluloseartiger Substanzen auf Grund der strukturellen und physikalischen Eigenschaften der Mikrofibrillen verschiedenste industrielle Anwendungsmöglichkeiten als Verstärkungsmittel für große Moleküle, insbesondere hochmolekulare Stoffe in Beziehung mit Wasser. Da solche Disaggregationsprodukte eine hohe Elastizität aufweisen, sind von Substanzen, bei denen zelluloseartige Disaggregationsprodukte in Papierform oder in fester Form verfestigt sind, auf Grund der strukturellen

Eigenschaften der Mikrofibrillen hervorragende mechanische Eigenschaften zu erwarten, und es gibt Anwendungsmöglichkeiten für verschiedenste industrielle Materialien.

[0004] Stand der Technik:

Schon lange sind Verfahren zur Herstellung von Zellulose bekannt, bei denen Mikroorganismen, die zur Familie Acetobacter gehören, gezüchtet werden (diese Mikroorganismen werden im Folgenden als „Zellulose produzierende Essigsäurebakterien“ bezeichnet). In der ungeprüften Veröffentlichung Nr. JP 62-265990, der ungeprüften Veröffentlichung Nr. JP 61-221201 etc. ist dies zum Beispiel beschrieben. Als Nähr- und Kulturmedium, das als zur Kultivierung von Zellulose produzierenden Essigsäurebakterien geeignet angesehen wird, ist das Kulturmedium nach Schramm und Hestrin bekannt, das aus Kohlenstoffquellen, Pepton, Hefeextrakt, Natriumphosphat und Zitronensäure besteht (Schramm et al., J. General Biology 11, S. 123-129, 1954). Wenn jedoch mit diesem Nähr- und Kulturmedium eine Kultur mit Schütteln oder Gasdurchblasen zum Rühren durchgeführt wird, ist die erhaltene produzierte Zellulosemenge gering, und auch die Wachstumsgeschwindigkeit ist nicht immer zufriedenstellend. Weiters sind, abgesehen von diesem Nähr- und Kulturmedium, auch Kulturmedien bekannt, denen Maisseinweichflüssigkeit (corn steep liquor, CSL), Malzextrakt o.ä. zugesetzt ist, aber es ist nicht bekannt, dass die in diesen natürlichen Nährstoffen (Pepton, Hefeextrakt, CSL, Malzextrakt etc.) enthaltenen speziellen Bestandteile zur Förderung des Wachstums der Zellulose beitragen. Als Faktoren, die durch bestimmte Nährstoffe in Kulturmedium das Wachstum der Zellulose fördern, sind derzeit Inosit, Phytinsäure, Pyrolochinolinchinon (PQQ) (geprüfte Veröffentlichung Nr. JP 5-1718; Mitsuo TAKAI, Shipagi Kyoshi [etwa: Vereinsblatt der Papierindustrie], Bd. 42, Nr. 3, S. 237-244) etc. bekannt, aber das Ausmaß des Wachstums der Zellulose ist noch immer nicht ausreichend, und diese Stoffe haben bei der Kultur unter Schütteln oder Rühren durch Gasdurchblasen auch keine deutlichen Erfolge gebracht.

[0005] Aufgaben, die durch die vorliegende Erfindung gelöst werden sollen:

Forschungen über organische Säuren und Essigsäurebakterien sind in Takeuchi et al., J. Ferment. Technol. Bd. 46, Nr. 4, S. 288-291, 1968; Nanba et al., Nihon Shokuhin Kogyo Gakkaishi [Zeitung der japanischen Gesellschaft der Lebensmittelindustrie], Bd. 32, Nr. 5, S. 331-377, 1985 etc. beschrieben, aber in dieser Literatur wurde der Einfluss von Essigsäurebakterien auf die Säureproduktion untersucht, und es findet sich keine Stelle, an der der Effekt der Förderung der Zelluloseproduktion von Zellulose produzierenden Essigsäurebakterien durch diese organischen Säuren erwähnt ist.

[0006] Das Ziel der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem mit Hilfe von Zellulose produzierenden Essigsäurebakterien die Produktivität zelluloseartiger Substanzen gesteigert werden kann und diese kostengünstig produziert werden können.

[0007] Mittel zur Lösung dieser Aufgaben:

Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben verschiedenste Studien gemacht, um das oben erwähnte Ziel zu erreichen, und fanden heraus, dass durch die Kultivierung von Mikroorganismen, die zur Familie Acetobacter gehören und die Fähigkeit zur Produktion von zelluloseartigen Substanzen haben (d.h. Zellulose produzierende Essigsäurebakterien), in Kulturmedium, dem bestimmte organische Säuren zugesetzt sind, die Produktivität der zelluloseartigen Substanzen im Vergleich mit herkömmlichen Herstellungsverfahren deutlich gesteigert werden kann.

[0008] Denn bei der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung von Zellulose zur Verfügung gestellt, wobei Mikroorganismen, die zur Familie Acetobacter gehören und die Fähigkeit zur Produktion von zelluloseartigen Substanzen haben, in Kulturmedium kultiviert werden, dem Carbonsäuren oder deren Salze als das Zellulosewachstum fördernde Faktoren zugesetzt sind, im Kulturmedium die Zellulose und die zelluloseartigen Substanzen wachsen gelassen und angesammelt werden, und diese Substanzen gewonnen werden.

[0009] Die bei der vorliegenden Erfindung verwendeten Mikroorganismen können alle Arten von Mikroorganismen sein, die

zur Familie Acetobacter gehören und zelluloseartige Substanzen produzieren. Als Beispiele können Acetobacter species BPR 2001, Acetobacter xylinum ATCC 23768, Acetobacter xylinum ATCC 23769, Acetobacter xylinum ATCC 10821 etc. angeführt werden.

[0010] Die bei der vorliegenden Erfindung verwendeten speziellen Carbonsäuren oder deren Salze wirken auf das Zellulosesynthesystem der Mikroorganismen als Faktoren, die das Wachstum der Zellulose fördern, und so kann die Produktivität von Zellulose deutlich gesteigert werden. Denn wie in den im Folgenden beschriebenen Ausführungsbeispielen zu sehen ist, ist die im Kulturmedium angesammelte Zellulosemenge im Vergleich zu Kulturen, denen keine Carbonsäuren zugesetzt wurden, bis zu etwa 1,5 bis 12 Mal größer. Der Ausdruck „Carbonsäuren oder deren Salze als Faktoren, die das Wachstum der Zellulose fördern“ bedeutet in der vorliegenden Beschreibung Carbonsäuren oder deren Salze, die im Vergleich zu Kulturen, denen sie nicht zugesetzt wurden, die angesammelte Zellulosemenge mindestens um das etwa 1,5-Fache steigern. Die Carbonsäuren, die bei der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, können sowohl gesättigte als auch ungesättigte Carbonsäuren sein; als gesättigte Carbonsäuren können z.B. Essigsäure, Milchsäure, Brenztraubensäure, Bernsteinsäure, Äpfelsäure, Glukonsäure, Glukuronsäure etc. angeführt werden, und als ungesättigte Carbonsäuren können Fumarsäure, Maleinsäure, Acrylsäure, Benzoessäure etc. angeführt werden. Bei diesen Carbonsäuren gibt es für die Kohlenstoffzahl und die Anzahl der Carboxylgruppen keine besonderen Einschränkungen, aber es ist günstig, wenn die Säuren wasserlöslich sind. Bevorzugte Carbonsäuren sind Milchsäure, Brenztraubensäure und Essigsäure. Wenn die Carbonsäuren als Salze verwendet werden, gibt es keine besonderen Einschränkungen, aber üblicherweise können Salze mit Alkalimetallen oder Erdalkalimetallen verwendet werden. Diese Carbonsäuren oder deren Salze können alleine verwendet werden, oder es können auch Kombinationen von 2 oder mehr Sorten verwendet werden. Auch für die zugesetzte Menge Carbonsäuren oder deren Salzen gibt es keine besonderen Einschränkungen, vorzugsweise liegt die Menge jedoch bei 1 mMol bis 200 mMol/l. Bei der vorliegenden Erfindung werden die Carbonsäuren oder deren Salze dem Kulturmedium nicht so sehr

als Hauptkohlenstoffquelle zugesetzt, sondern vielmehr kann durch die Zugabe von nur winzigen oder geringen Mengen als Faktoren, die das Wachstum der Zellulose fördern, die Zelluloseproduktion deutlich gesteigert werden.

[0011] In der Zusammensetzung des Kulturmediums können als Kohlenstoffquellen Saccharose, Glukose, Fruktose, Mannit, Sorbit, Galaktose, Maltose, Erythrit, Gadonit [phonetische Transkription; diese Substanz konnte nicht verifiziert werden; Anm. d. Ü.], Glycerin, Ethylenglykol, Ethanol etc. alleine oder in Kombination verwendet werden. Es können auch diese enthaltende Stärkehydrolysate, Titolas-Melasse [phonetische Transkription; diese Substanz konnte nicht verifiziert werden; Anm. d. Ü.], Rübenmelasse, Rübenpresssaft, Zuckerrohrpresssaft, Fruchtsäfte, angefangen von Zitrusfrüchten etc., verwendet werden.

[0012] Als Stickstoffquelle können Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat u.ä. Ammoniumsalze, Salze der Schwefelsäure, Harnstoff u.ä. organische oder anorganische Stickstoffquellen verwendet werden, oder es können auch Bact-Peptide, Bact-Soytöne, Yeast-Extract, konzentriertes Hydrolysat von Sojaprotein u.ä. stickstoffhaltige natürliche Nährstoffquellen verwendet werden. Als organische Nährstoffe in Spuren können auch Aminosäuren, Vitamine, Fettsäuren, Nukleinsäuren und 2,7,9-Tricarboxy-1H-pyrido[2,3,5]-chinolin-4,5-dion zugesetzt werden.

[0013] Wenn Varianten mit Nährstoffbedürfnissen verwendet werden, die zum Wachsen Aminosäuren o.ä. brauchen, müssen die erforderlichen Nährstoffe zugeführt werden. Als anorganische Salze können Salze der Phosphorsäure, Magnesiumsalze, Calciumsalze, Eisensalze, Mangansalze, Kobaltsalze, Molybdänsalze, rotes Kaliumprussiat, Metallchelate etc. eingesetzt werden.

[0014] Der pH der Kultur wird zwischen 3 und 7, vorzugsweise in der Nähe von 5 gehalten.

[0015] Die Kultivierung erfolgt bei einer Temperatur im Bereich von 10 bis 40°C, vorzugsweise 25 bis 35°C.

[0016] Die dem Kulturgefäß zugeführte Sauerstoffkonzentration sollte bei 1 bis 100%, vorzugsweise 21 bis 80% liegen.

[0017] Das erfindungsgemäße Verfahren ist nicht auf ein Kulturverfahren beschränkt, es können sowohl Kulturen in Ruhe als auch Schütteln oder Rühren durch Gasdurchblasen eingesetzt werden. Es ist auch ein Merkmal der vorliegenden Erfindung, dass auch bei einer Kultivierung unter Schütteln oder Rühren durch Gasdurchblasen die Zelluloseproduktivität nicht beeinflusst wird.

[0018] Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten zelluloseartigen Substanzen können, so wie sie anfallen, verwendet werden, oder sie können behandelt werden, um die in dieser Grundsubstanz vorhandenen nicht-zelluloseartigen Substanzen, angefangen mit Bakterien, zu entfernen.

[0019] Um Verunreinigungen zu entfernen, können Spülen mit Wasser, Wasserentfernung unter Druck, Spülung mit verdünnter Säure, Spülung mit Alkali, Behandlung mit Toluol und Essigsäureethyl u.ä. polaren organischen Säuren, Behandlung mit Bleichmitteln, wie z.B. Natriumhypochlorit und Wasserstoffperoxid, Behandlung mit Lysozym o.ä. Bakterien lösenden Enzymen, Behandlung mit oberflächenaktiven Mitteln, wie Natriumlaurylsulfat, Desoxycholsäure etc., Spülung unter Erwärmung im Bereich von Normaltemperatur bis 200°C o.ä. Verfahren einzeln oder in Kombination durchgeführt werden, um dadurch die Verunreinigungen aus den zelluloseartigen Substanzen zu entfernen.

[0020] Die auf diese Weise erhaltenen, in der vorliegenden Erfindung angesprochenen zelluloseartigen Substanzen bezeichnen folgende:

[0021] Die erfindungsgemäßen zelluloseartigen Substanzen sind Zellulose, Substanzen, die Hetero-Mehrfachzucker mit Zellulose als Hauptkette enthalten, und Substanzen, die β -1,3-, β -1,2- u.ä. Glukane enthalten. Bei Hetero-Mehrfachzuckern sind die strukturellen Bestandteile außer Zellulose Mannose, Fruktose, Galaktose, Xylose, Arabinose, Rhamnose, Glukuronsäure u.ä. 6-Kohlenstoff-Zucker, 5-Kohlenstoff-Zucker sowie organische Säuren etc.

[0022] Es gibt Fälle, in denen diese o.ä. Mehrfachzucker eine einheitliche Substanz sind, es können aber auch 2 oder mehr Mehrfachzucker, verbunden durch Wasserstoffbindungen etc., gemeinsam vorhanden sein.

[0023] Ausführungsbeispiele:

Im Folgenden wird die vorliegende Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen noch detaillierter erläutert.

[0024] Kulturbedingungen:

Die Zellulose produzierenden Essigsäurebakterien wurden unter Verwendung eines Kolbenkulturverfahrens und eines Standgefäßfermenter-Kulturverfahren (jar fermenter) kultiviert.

[0025] Kolbenkulturverfahren:

In einen 750 ml Roux-Kolben, der mit 100 ml Grundkulturmedium mit einem anfänglichen pH von 5,0 aus 40 g/l Fruktose, 1,0 g/l Kaliumphosphat, 0,3 g/l Magnesiumsulfat, 3 g/l Ammoniumsulfat, 5 g/l Bact-Peptone und 1,4 m/l [wahrscheinlich Druckfehler im Original; vgl. Abs. [0032]; Anm. d. Ü.] Milchsäure versehen war, wurde 1 ml tiefgekühlt gelagerte Bakterienflüssigkeit von Zellulose produzierenden Essigsäurebakterien zugesetzt, und in einem Niedrigtemperatur-Kulturgerät wurde bei 28°C 3 Tage lang in Ruhe kultiviert. Nach dieser Starter-Kultivierung wurde der Roux-Kolben gut geschüttelt, danach der Inhalt unter bakterienfreien Bedingungen durch Gaze filtriert und in Zelluloseeteilchen und Bakterien getrennt. Dann wurde bei 10 000 Upm 15 Minuten lang zentrifugiert, die Medium-Bestandteile und die Bakterien-Bestandteile (+ winzige Zellulose) getrennt, dann wurden die Bakterien (+ winzige Zellulose) 1 bis 2 Mal in bakterienreduzierter physiologischer Kochsalzlösung gespült und das Zentrifugieren wiederholt. Den gespülten Bakterien wurde die erforderliche Menge bakterienreduzierte physiologische Kochsalzlösung zugesetzt, und nach dem Rühren wurde dies als Starterkulturflüssigkeit genommen.

[0026] Dann wurden 7,5 ml dieser Starterkulturflüssigkeit in einen 300 ml Spiral-Umlenkkolben (spiral baffle flasco) gegeben, in dem sich 67,5 ml Prüfmedium befanden. Unter Verwendung eines Schüttelkulturgeräts wurde unter den Bedingungen einer Schüttelbreite von 2 cm, einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 180 Upm und einer Temperatur von 28°C unter Rotationsschütteln 4 Tage lang die Hauptkultivierung durchgeführt.

[0027] Die Quantifizierung der produzierten Bakterienzellulose wurde wie folgt durchgeführt. Die in den einzelnen Kolben vorhandenen Feststoffe wurden mit Wasser gespült und die

Kulturmediumbestandteile entfernt, danach wurde 20 Minuten lang bei 110°C mit 1% wässriger NaOH-Lösung behandelt und die Bakterien entfernt, dann wurde die Zellulose so lange mit Wasser gewaschen, bis die Waschflüssigkeit etwa neutral war, danach wurde bei 80°C vakuumgetrocknet und die Trockenmasse gemessen.

[0028] Standgefäßfermenter-Kulturverfahren:

In einen 750 ml Roux-Kolben, in dem sich 100 ml des o.g. Grundkulturmediums befanden, wurde 1 ml tiefgefroren gelagerte Bakterienlösung von Zellulose produzierenden Essigsäurebakterien gegeben und in einem Niedrigtemperatur-Kulturgerät bei 28°C 3 Tage lang in Ruhe kultiviert. Nach Beendigung der ruhigen Kultivierung wurde der Roux-Kolben gut geschüttelt, dessen Inhalt unter bakterienfreien Bedingungen durch Gaze filtriert und in Zelluloseteilchen und Bakterien aufgetrennt. 7,5 ml der erhaltenen Bakterienflüssigkeit wurden in einen 300 ml Spiral-Umlenkkolben gegeben, in dem sich 67,5 ml Grundkulturmedium befanden, und unter Verwendung eines Schüttelkulturgeräts unter den Bedingungen einer Schüttelbreite von 2 cm, einer Rotationsgeschwindigkeit von 180 Upm und einer Temperatur von 28°C unter Rotationsschütteln 3 Tage lang eine Starterkultivierung durchgeführt.

[0029] Nach Beendigung der Kultivierung wurde der Inhalt des Kolbens in einen bakterienfreien Mixer gegeben und bei 10 000 Upm 3 Minuten lang zerkleinert. Dieser zerkleinerte Inhalt wurde als Starter-Bakterienflüssigkeit genommen und damit die folgende Hauptkultivierung durchgeführt. Die Starter-Bakterienflüssigkeit wurde bei 10 000 Upm 20 Minuten lang zentrifugiert, und es wurde überprüft, dass sich im erhaltenen Überstand keine Milchsäure mehr befindet.

[0030] 60 ml der Starter-Bakterienflüssigkeit wurden bakterienfrei in einen kleinen Standgefäßfermenter (Gesamtvolumen 1000 ml) gegeben, in dem sich 540 ml bakterienreduziertes Prüfkulturmedium befanden, und die Hauptkultivierung erfolgte bei 30°C 20 Stunden oder 30 Stunden lang, wobei der pH mit 1N NaOH oder 1N H₂SO₄ auf 5,0 gehalten wurde und die Rührumdrehungszahl am Anfang 400 Upm betrug und automatisch derart geregelt wurde, dass die Menge gelösten Sauerstoffs (DO) in den Bereich von 3,0 bis 21,0% kam.

[0031] Nach Beendigung der Kultivierung wurden die Feststoffe aus dem Standgefäßfermenter gesammelt, mit Wasser gewaschen, der Kulturmediumanteil wurde entfernt, dann wurde 20 Minuten lang bei 110°C mit 1% wässriger NaOH-Lösung behandelt und die Bakterien entfernt. Nachdem die hergestellte Zellulose so lange mit Wasser gewaschen worden war, bis die Waschflüssigkeit etwa neutral war, wurde sie bei 80°C 12 Stunden lang vakuumgetrocknet und die Trockenmasse gemessen.

[0032] Ausführungsbeispiel 1: Wirkung der Zugabe von Milchsäure zu den einzelnen organischen Stickstoffquellen:

Als Zellulose produzierende Essigsäurebakterien wurde der Stamm Acetobacter species BPR 2001 verwendet, und als Prüfkulturmedium wurde ein Kulturmedium verwendet, das die folgenden unterschiedlichen organischen Stickstoffquellen enthielt:

Fruktose	40 g/l,
KH ₂ PO ₄	1,0 g/l,
MgSO ₄	0,3 g/l,
(NH ₄) ₂ SO ₄	3 g/l,
organische Stickstoff- (N-)Quelle	5 g/l,
Bact-Peptide (Produkt der Firma Difco);	
Bact-Soytone (Produkt der Firma Difco);	
Yeast-Extract (Produkt der Firma Difco);	

oder

konzentriertes Säurehydrolysat von Sojaprotein,

Milchsäure 0 oder 1,4 ml/l,

pH am Anfang 5,0.

Nach der oben beschriebenen Kolbenkultivierung wurde die Hauptkultivierung 2 oder 4 Tage lang durchgeführt und in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Milchsäure die angesammelte Zellulosemenge evaluiert.

[0033] Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 angegeben.

[0034] Tabelle 1:

organische N-Quelle	angesammelte Zellulosemenge (g/l)	
	nach 2 Tagen Kultivierung	nach 4 Tagen Kultivierung
Bact-Soytone	0,27	0,66
Bact-Soytone + Milchsäure	3,04	3,31
Yeast-Extract	0,22	0,86
Yeast-Extract + Milchsäure	2,67	4,13
Bact-Peptide	0,14	0,37
Bact-Peptide + Milchsäure	0,82	1,80
konzentriertes Säurehydrolysat von Sojaprotein	0,24	0,94
konzentriertes Säurehydrolysat von Sojaprotein + Milchsäure	1,37	4,66

[0035] Aus den Ergebnissen in Tabelle 1 ist erkennbar, dass dann, wenn dem Kulturmedium Milchsäure zugesetzt worden ist, im Vergleich zum Nicht-Zusetzen bei allen organischen N-Quellen die angesammelte Zellulosemenge um das etwa 5- bis 12-Fache gestiegen ist. Nach Größe des Zuwachses je nach verwendeter organischer N-Quelle gereiht ergibt sich nach 4 Tagen die Reihung Bact-Peptide < Bact-Soytone < Yeast-Extract < konzentriertes Säurehydrolysat von Sojaprotein.

[0036] Ausführungsbeispiel 2: Wirkung des Zusatzes von anderen Carbonsäuren als Milchsäure:

Es wurde genau so kultiviert wie in Ausführungsbeispiel 1, außer dass als organische Stickstoffquelle Bact-Soytone und als Carbonsäure außer Milchsäure auch 10 mMol/l Essigsäure und Brenztraubensäure zugesetzt bzw. nicht zugesetzt wurden, und es wurde die Wirkung der Zugabe von anderen Carbonsäuren als Milchsäure auf die angesammelte Zellulosemenge ermittelt.

[0037] Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 angegeben.

[0038] Tabelle 2

Carbonsäure	angesammelte Zellulosemenge (g/l)	
	nach 2 Tagen Kultivierung	nach 4 Tagen Kultivierung
ohne Zusatz	0,27	0,68
Essigsäure	1,00	1,50
Brenztraubensäure	1,51	2,16
Milchsäure	1,66	3,23

[0039] Anhand von Tabelle 2 stellt sich heraus, dass auch dann, wenn als Carbonsäure Essigsäure und Brenztraubensäure verwendet werden, die angesammelte Zellulosemenge im Vergleich zum Fall des Nicht-Zusatzes um das etwa 2- bis etwa 6-Fache gestiegen ist. Eine Evaluierung nach 4 Tagen Kultivierung zeigte, dass das Ausmaß des Anstiegs nach Art der Säure die Reihenfolge Essigsäure < Brenztraubensäure < Milchsäure ergab.

[0040] Ausführungsbeispiel 3: Einfluss der Menge der zugesetzten Carbonsäure auf die angesammelte Zellulosemenge:

Es wurde wie in Ausführungsbeispiel 1 vier Tage lang kultiviert, außer dass als organische Stickstoffquelle Bact-Soytöne verwendet und von Milchsäure jeweils 0,1 ml/l, 0,5 ml/l, 1,0 ml/l, 5,0 ml/l, 10,0 ml/l und 15,0 ml/l zugesetzt wurden, und es wurde die angesammelte Zellulosemenge je nach zugesetzter Menge ausgewertet.

[0041] Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 angegeben.

[0042] Tabelle 3

zugesetzte Menge Milchsäure (ml/l)	0	0,1	0,5	1,0	5,0	10,0	15,0
angesammelte Zellulosemenge (g/l)	0,75	1,5	1,8	3,5	4,5	6,0	5,2

[0043] Die Ergebnisse in Tabelle 3 zeigen, dass bei einem Zusatz von Milchsäure von 0,1 ml/l bis 10,0 ml/l die angesammelte Zellulosemenge auch schrittweise ansteigt, dass jedoch, wenn die

Menge der zugesetzten Milchsäure noch gesteigert wird, die angesammelte Zellulosemenge im Gegenteil tendenziell geringer wird.

[0044] Ausführungsbeispiel 4: Einfluss der Bakterienstämme auf die angesammelte Zellulosemenge:

Es wurde nach dem gleichen Verfahren wie in Ausführungsbeispiel 1 vier Tage lang kultiviert, außer dass als Zellulose produzierende Essigsäurebakterien außer *Acetobacter species* BPR 2001 *Acetobacter xylinum* ATCC 23768 und *Acetobacter xylinum* ATCC 23769, sowie als organische Stickstoffquelle Bact-Soytone verwendet wurden, und es wurde die angesammelte Zellulosemenge der einzelnen Bakterienstämme gemessen.

[0045] Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 angegeben.

[0046] Tabelle 4

Bakterienstamm	angesammelte Zellulosemenge (g/l)	
	ohne Zugabe von Milchsäure	Zugabe von Milchsäure
<i>Acetobacter species</i> BPR 2001	0,76	3,36
ATCC 23768	0,17	1,20
ATCC 23769	0,79	2,09

[0047] Die Ergebnisse von Tabelle 4 zeigen, dass die tatsächlich angesammelte Menge Zellulose je nach den drei verwendeten Bakterienstämmen verschieden ist, aber bei allen Bakterienstämmen wurde die angesammelte Zellulosemenge durch den Zusatz von Milchsäure um das etwa 2,5- bis 7-Fache gesteigert. Besonders *Acetobacter species* BPR 2001 und *Acetobacter xylinum* ATCC 23769 wiesen eine hohe Zelluloseproduktion auf.

[0048] Ausführungsbeispiel 5: Standgefäßfermenter-Kultur von Zellulose produzierenden Essigsäurebakterien:

Als Zellulose produzierende Essigsäurebakterien wurden *Acetobacter species* BPR 2001 und als Prüfkulturmedium ein Kulturmedium mit folgender Zusammensetzung verwendet:

Fructose 40 g/l,
 KH₂PO₄ 1,0 g/l,

MgSO₄ 0,3 g/l,
 (NH₄)₂SO₄ 3 g/l,
 Bact-Soytone 5 g/l,
 Milchsäure 0 oder 1,4 ml/l,
 anfänglicher pH 5,0

Nach dem o.g. Standgefäßfermenter-Kulturverfahren wurde die Hauptkultivierung 20 Stunden oder 30 Stunden lang durchgeführt und die angesammelte Zellulosemenge in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Milchsäure ausgewertet.

[0049] Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 angegeben.

[0050] Tabelle 5

mit/ohne Milchsäure	angesammelte Zellulosemenge (g/l)	
	20 Std. Kultivierung	30 Std. Kultivierung
ohne Milchsäure	2,1	4,5
mit Milchsäure	5,0	7,0

[0051] Tabelle 5 zeigt, dass die Zelluloseproduktion auch ohne Zusatz von Milchsäure deutlich gesteigert ist, wenn ein Standgefäßfermenter verwendet wird und der pH, die Menge des gelösten Sauerstoffs u.ä. Fermentationsbedingungen unter Kontrolle gehalten werden, aber durch den Zusatz von Milchsäure kann die angesammelte Zellulosemenge im Vergleich zum Nicht-Zusatz noch weiter um das etwa 1,5- bis etwa 2,5-Fache gesteigert werden.

[0052] Wirkung der Erfindung:

Bei der Zelluloseproduktion unter Verwendung des erfindungsgemäßen Fermentationsverfahrens wird die Produktivität der Zellulose durch den Zusatz von nur winzigen oder geringen Mengen Carbonsäuren oder deren Salzen zum Kulturmedium im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren deutlich gesteigert. Dies zeigt, dass Zellulose gemäß dem vorliegenden Verfahren effizient und kostengünstig hergestellt werden kann.

[ÄNDERUNGEN IM ZUGE DES VERFAHRENS]

[Datum] 18. 08. 1993

[Änderung 1]

[Gegenstand der Änderung] Beschreibung

[Absatz der Änderung] 0009

[Art der Änderung] Abänderung

[Inhalt der Änderung]

[0009] Die bei der vorliegenden Erfindung verwendeten Mikroorganismen können alle Arten von Mikroorganismen sein, die zur Familie Acetobacter gehören und zelluloseartige Substanzen produzieren. Als Beispiele können Acetobacter species BPR 2001 (FERM P-13466), Acetobacter xylinum ATCC 23768, Acetobacter xylinum ATCC 23769, Acetobacter xylinum ATCC 10821 etc. angeführt werden.

[Änderung 2]

[Gegenstand der Änderung] Beschreibung

[Absatz der Änderung] 0010

[Art der Änderung] Abänderung

[Inhalt der Änderung]

[0010] Die bei der vorliegenden Erfindung verwendeten speziellen Carbonsäuren oder deren Salze wirken auf das Zellulosesynthesystem der Mikroorganismen als Faktoren, die das Wachstum der Zellulose fördern, und so kann die Produktivität von Zellulose deutlich gesteigert werden. Denn wie in den im Folgenden beschriebenen Ausführungsbeispielen zu sehen ist, ist die im Kulturmedium angesammelte Zellulosemenge im Vergleich zu Kulturen, denen keine Carbonsäuren zugesetzt wurden, bis zu etwa 1,5 bis 12 Mal größer. Der Ausdruck „Carbonsäuren oder deren Salze als Faktoren, die das Wachstum der Zellulose fördern“ bedeutet in der vorliegenden Beschreibung Carbonsäuren oder deren Salze, die im Vergleich zu Kulturen, denen sie nicht zugesetzt wurden, die angesammelte Zellulosemenge steigern, vorzugsweise mindestens um das etwa 1,5-Fache. Die Carbonsäuren, die bei der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, können sowohl gesättigte als auch ungesättigte Carbonsäuren sein; als gesättigte Carbonsäuren können z.B. Essigsäure, Milchsäure, Brenztraubensäure, Bernsteinsäure, Äpfelsäure, Glukonsäure, Glukuronsäure etc. angeführt werden, und als ungesättigte

Carbonsäuren können Fumarsäure, Maleinsäure, Acrylsäure, Benzoessäure etc. angeführt werden. Bei diesen Carbonsäuren gibt es für die Kohlenstoffzahl und die Anzahl der Carboxylgruppen keine besonderen Einschränkungen, aber es ist günstig, wenn die Säuren wasserlöslich sind. Bevorzugte Carbonsäuren sind Milchsäure, Brenztraubensäure und Essigsäure. Wenn die Carbonsäuren als Salze verwendet werden, gibt es keine besonderen Einschränkungen, aber üblicherweise können Salze mit Alkalimetallen oder Erdalkalimetallen verwendet werden. Diese Carbonsäuren oder deren Salze können alleine verwendet werden, oder es können auch Kombinationen von 2 oder mehr Sorten verwendet werden. Auch für die zugesetzte Menge Carbonsäuren oder deren Salzen gibt es keine besonderen Einschränkungen, vorzugsweise liegt die Menge jedoch bei 1 mMol bis 200 mMol/l. Bei der vorliegenden Erfindung werden die Carbonsäuren oder deren Salze dem Kulturmedium nicht so sehr als Hauptkohlenstoffquelle zugesetzt, sondern vielmehr kann durch die Zugabe von nur winzigen oder geringen Mengen als Faktoren, die das Wachstum der Zellulose fördern, die Zelluloseproduktion deutlich gesteigert werden.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-39386

(43) 公開日 平成7年(1995)2月10日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 19/04	C	7432-4B		
C 0 8 B 37/00	P	7433-4C		
// (C 1 2 P 19/04				
C 1 2 R 1:02)				

審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全7頁)

(21) 出願番号 特願平5-191467

(22) 出願日 平成5年(1993)8月2日

(71) 出願人 593041273

株式会社バイオポリマー・リサーチ
神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2番1号

(72) 発明者 松岡 昌伸

神奈川県川崎市高津区溝口34-3-402

(72) 発明者 竹村 浩

神奈川県川崎市高津区下作延544-1

(72) 発明者 土田 隆康

神奈川県横浜市戸塚区上倉田町1730-13

(72) 発明者 吉永 文弘

神奈川県藤沢市片瀬山4-13-6

(74) 代理人 弁理士 川口 義雄 (外2名)

(54) 【発明の名称】 バクテリアセルロースの製造方法

(57) 【要約】

【構成】 アセトバクター属に属しセルロース性物質生産能を有する微生物を、セルロース生成促進因子としてのカルボン酸又はその塩を添加した培地で培養し、培地中にセルロース、セルロース性物質を生成蓄積せしめ、該物質を採取することを包含するセルロースの製造方法。

【効果】 セルロース生産性が著しく向上する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アセトバクター属に属しセルロース性物質生産能を有する微生物を、セルロース生成促進因子としてのカルボン酸又はその塩を添加した培地中で培養し、培地中にセルロース、セルロース性物質を生成蓄積せしめ、該物質を採取することを包含するセルロースの製造方法。

【請求項2】 カルボン酸又はその塩が乳酸、ヒルビン酸もしくは酢酸、又はそれらの塩であることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】 カルボン酸又はその塩を培地中に1~200mmol/L添加することを特徴とする請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】 培養が静置、振盪又は通気攪拌培養であることを特徴とする請求項1~3のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、アセトバクター属に属しセルロース性物質を生産する能力を有する微生物が生産するセルロース性物質の製造方法に関する。より具体的には、セルロース生成促進因子として特定の有機酸を含有する培地中での該微生物によるセルロース性物質の生産に関する。

【0002】このセルロース性物質は可食性であり食品分野で利用されるほか水系分散性に優れているので食品、化粧品又は塗料等の粘度の保持、食品原料生地の強化、水分の保持、食品安定性向上、低カロリー添加物又は乳化安定化助剤としての産業上利用価値がある。

【0003】また、該セルロース性物質の離解物はマイクロフィブリルの構造的物理的特徴に基づき高分子、特に水系高分子用補強剤として各種の産業用途がある。このような離解物は高い引張弾性率を示すので該セルロース性離解物を紙状または固型状に固化した物質はマイクロフィブリルの構造的特徴に基づくすぐれた機械特性が期待され、各種産業用素材としての応用がある。

【0004】

【従来の技術】従来より、アセトバクター属に属する微生物を培養して、セルロースを生産する方法は知られている（この微生物を以後「セルロース生産性酢酸菌」と称する）。例えば、特開昭62-265990号公報、特開昭61-221201等に、その記載がある。セルロース生産性酢酸菌の培養を行なう際に適当とされている栄養培地としては、炭素源、ペプトン、酵母エキス、燐酸ナトリウム及びクエン酸からなる Schramm/Hestrin 培地 (Schramm ら、J. General Biology, 11, pp.123~129, 1954) が知られている。しかしながら、上記栄養培地で振盪もしくは通気攪拌培養を行なった場合、得られるセルロース生産量は低く、生成速度も必ずしも満足のいくものではなかった。また、上記栄養培地の他

に、コーンステープリカー (CSL) や麦芽エキス等を加えた培地が知られているが、これら天然栄養素 (ペプトン、酵母エキス、CSL、麦芽エキスなど) に含まれる特定成分がセルロース生成促進に関与していることは知られていない。培地中の特定栄養素によるセルロース生成促進因子として、現在知られているものにはイノシトール、フィチン酸、ピロロキノリンキノン (PQQ) (特公平5-1718号公報; 高井光男, 紙パ技協誌, 第42巻, 第3号, 第237~244頁) 等があるが、セルロース生成量はまだ不十分であり、またこれらの振盪もしくは通気攪拌培養における効果も明確ではなかった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】有機酸と酢酸菌における研究は、Takeuchi ら、J. Ferment. Technol. Vol.46, No.4, pp. 288~291, 1968年、南場ら、日本食品工業学会誌, 第32巻, 第5号, 第331~337頁, 1985年などに記載されているが、これらの文献は、酢酸菌の酸生成に及ぼす影響について研究したものであり、セルロース生産性酢酸菌のこれら有機酸によるセルロース生産促進効果について言及したものは見当たらない。

【0006】本発明の目的は、セルロース生産性酢酸菌を用いてセルロース性物質の生産性を向上させ安価に製造する方法を開発することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の目的を達成するために種々の研究を行ない、アセトバクター属に属しセルロース性物質を生産する能力を有する微生物 (すなわちセルロース生産性酢酸菌) を特定の有機酸を添加した培地中で培養することにより、従来の製造法に比べて著しくセルロース性物質の生産性が向上することを見出した。

【0008】即ち、本発明は、アセトバクター属に属しセルロース性物質生産能を有する微生物を、セルロース生成促進因子としてのカルボン酸又はその塩を添加した培地中で培養し、培地中にセルロース、セルロース性物質を生成蓄積せしめ該物質を採取することを包含するセルロースの製造方法を提供する。

【0009】本発明において使用される微生物はアセトバクター属に属し、セルロース性物質を生産する微生物であればどのようなものでもよい。例えば、アセトバクター・スピーシーズ (Acetobacter sp.) BPR2001株、アセトバクター・キシリナム (Acetobacter xylinum) ATCC23768、アセトバクター・キシリナム ATCC23769、アセトバクター・キシリナム ATCC10821などが挙げられる。

【0010】本発明方法で使用される特定のカルボン酸又はその塩は、セルロース生成促進因子として該微生物のセルロース生合成系に作用して、セルロースの生産性を著しく向上させる。すなわち、後述する実施例に示す

ように、培地中のセルロース蓄積量はカルボン酸無添加の場合と比較して約1.5倍～約12倍に達する。本明細書中「セルロース生成促進因子としてのカルボン酸又はその塩」は、カルボン酸又はその塩を添加しない場合と比較してセルロース蓄積量を約1.5倍以上増加させるカルボン酸又は塩を指す。本発明で使用し得るカルボン酸は飽和又は不飽和カルボン酸のいずれでもよく、例えば、飽和カルボン酸として酢酸、乳酸、ビルビン酸、コハク酸、リンゴ酸、グルコン酸、グルクロン酸などが挙げられ、また、不飽和カルボン酸としてフマル酸、マレイン酸、アクリル酸、安息香酸などが挙げられる。これらカルボン酸は、炭素数、カルボキシル基に特に制限はないが、水溶性であることが望ましい。好ましいカルボン酸は乳酸、ビルビン酸、酢酸である。カルボン酸を塩として使用するときは、特に制限されないが、通常アルカリ金属又はアルカリ土類金属の塩を使用し得る。これらのカルボン酸又はその塩は単独で使用してもよいし、また2種以上組み合わせ使用することもできる。また、カルボン酸又はその塩の添加量は特に制限されないが、好ましくは1mmol～200mmol/Lである。本発明においては、カルボン酸又はその塩は主要炭素源として培地に添加するよりはむしろ、セルロース生成促進因子として微量もしくは少量添加するだけでセルロース生産性を顕著に向上させることができる。

【0011】培地組成物中、炭素源としてはシュクロース、グルコース、フラクトース、マンニトール、ソルビトール、ガラクトース、マルトース、エリスリット、ガドニット、グリセリン、エチレングリコール、エタノール等が単独或いは併用して用いられる。更にはこれらのものを含有する澱粉水解物、チトラスモラセス、ビートモラセス、ビート搾汁、サトウキビ搾汁、柑橘類を始めとする果汁等が使用できる。

【0012】また、窒素源としては硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩、硝酸塩、尿素等有機或いは無機の窒素源が使用されてもよいし、或いはBact-Peptide、Bact-Soytone、Yeast-Extract、豆濃などの含窒素天然栄養源が使用されてもよい。有機微量栄養素としてアミノ酸、ビタミン、脂肪酸、核酸、2, 7, 9-トリカルボキシ-1Hピロロ[2, 3-5]-キノリン-4, 5-ジオンを添加してもよい。

【0013】生育にアミノ酸等を要求する栄養要求性変異株を使用する場合には、要求される栄養素を補添することが必要である。無機塩類としてはリン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩、マンガン塩、コバルト塩、モリブデン酸塩、赤血塩、キレート金属類等が使用される。

【0014】培養のpHは3ないし7に、望ましくは5付近に制御する。

【0015】培養温度は10～40℃、望ましくは25

～35℃の範囲で行う。

【0016】培養槽に供給する酸素濃度は1～100%、望ましくは21～80%であれば良い。

【0017】本発明方法では、培養方法に制限を受けず、静置、振盪もしくは通気攪拌培養のいずれでもよい。振盪もしくは通気攪拌下での培養であってもセルロース生産性に影響を及ぼさないことも本発明方法の特徴の1つである。

【0018】本発明の方法によって生成されるセルロース性物質はそのまま採取してもよく、さらに本物質中に含まれる菌体を始めとするセルロース性物質以外の物質を取り除く処理をほどこしてもよい。

【0019】不純物を取り除くためには水洗、加圧脱水、希酸洗浄、アルカリ洗浄トルエン及び酢酸エチルなどの極性有機溶媒による処理、次亜塩素酸ソーダ及び過酸化水素などの漂白剤による処理、リゾチームなどの菌体溶解酵素による処理、ラウリル硫酸ソーダ、デオキシコール酸などの界面活性剤による処理、常温から200℃の範囲の加熱洗浄などを単独及び併用してほどこすことによりセルロース様物質から不純物を除去することができる。

【0020】このようにして得られた本発明でいうセルロース性物質とは以下のものをいう。

【0021】本発明のセルロース性物質とはセルロース及び、セルロースを主鎖としたヘテロ多糖を含むもの及びβ-1, 3、β-1, 2等のグルカンを含むものである。ヘテロ多糖の場合のセルロース以外の構成成分はマンノース、フラクトース、ガラクトース、キシロース、アラビノース、ラムノース、グルクロン酸等の六炭糖、五炭糖及び有機酸等である。

【0022】なおこれ等の多糖が単一物質である場合もあるし2種以上の多糖が水素結合等により混在してもよい。

【0023】

【実施例】以下の実施例により、本発明をさらに詳細に説明する。

【0024】培養条件

セルロース生産性酢酸菌をフラスコ培養法及びジャーファメンター培養法を用いて培養した。

【0025】フラスコ培養法

フラクトース40g/L、リン酸一カリウム1.0g/L、硫酸マグネシウム0.3g/L、硫酸アンモニウム3g/L、バクトーペプトン5g/L、乳酸1.4m/L、初発pH5.0の組成の基本培地100mlを張り込んだ750ml容Rouxフラスコに、セルロース生産性酢酸菌の凍結保存菌液1mlを植菌し、低温培養器内で28℃で3日間静置培養を行った。このシード培養後、前記Rouxフラスコをよく振盪した後、無菌条件下で内容物をガーゼ濾過しセルロース片と菌体を分離した。次に10,000rpmで15分間遠心分離し、培

5

地成分と菌体(＋微小セルロース)を分離し、さらに滅菌生理食塩水で1～2回菌体(＋微小セルロース)を洗浄、遠心分離を繰り返した。洗浄された菌体に必要量の滅菌生理食塩水を加え、攪拌後これをシード菌液とした。

【0026】次に、シード菌液7.5mlを検討培地67.5mlを張り込んだ300ml容スパイラルバッフルフラスコに植菌した。振盪培養機を用い、振幅2cm、回転速度180rpm、温度28℃の条件で回転振盪しながら4日間メイン培養を行った。

【0027】産生されたバクテリアルセルロースの定量は次のようにして行った。すなわち、各フラスコ内の固形物を水洗して培地成分を除去した後、1%NaOH水溶液中で110℃、20分間処理して菌体を除去し、さらに、洗浄液が中性付近になるまでセルロースを水洗し、80℃で真空乾燥して乾燥重量を測定した。

【0028】ジャーファメンター培養法

上記基本培地100mlを張り込んだ750ml容Rouxフラスコにセルロース生産性酢酸菌の凍結保存菌液1mlを植菌し、低温培養機内で28℃で3日間静置培養を行なった。静置培養終了後、Rouxフラスコをよく振盪し、その内容物を無菌条件下でガーゼ濾過してセルロース片と菌体を分離した。得られた菌液7.5mlを基本培地67.5mlを張り込んだ300ml容スパイラルバッフルフラスコに植菌し、振盪培養機を用いて振幅2cm、回転速度180rpm、温度28℃の条件で回転振盪しながら3日間シード培養を行なった。

【0029】培養終了後、フラスコの内容物を無菌ブレンダーに移し、10,000rpmで3分間破碎処理を行なった。この破碎された内容物をシード菌液とし、以下のメイン培養に使用した。なお、シード菌液を10,000rpmで20分間遠心分離し、得られた上清中に乳酸が残留していないことを確認した。

【0030】上記シード菌液60mlを滅菌済み検討培地540mlを張り込んだ小型ジャーファメンター(全

6

容量1,000ml)に無菌的に植菌し、30℃で20時間又は30時間、pHを1N NaOHもしくは1N H_2SO_4 でpH5.0にコントロールしながら、また、攪拌回転数を初発400rpmで、溶存酸素量(DO)が3.0～21.0%内に入るように回転数を自動制御しながらメイン培養を行なった。

【0031】培養終了後、ジャーファメンター内の固形物を集積し、水洗して培地成分を除去した後、1%NaOH水溶液中で110℃、20分間処理して菌体を除去した。さらに、洗浄液が中性付近になるまで生成セルロースを水洗した後、80℃で12時間真空乾燥して乾燥重量を測定した。

【0032】実施例1 各種有機窒素源における乳酸添加効果

セルロース生産性酢酸菌としてアセトバクター・スピーシーズBPR2001株をまた、検討培地として異なる下記有機窒素源を含有する下記組成：

フラクトース	40g/L、
KH_2PO_4	1.0g/L、
$MgSO_4$	0.3g/L、
$(NH_4)_2SO_4$	3g/L、
有機窒素(N)源	5g/L、
Bact-Peptide (Difco社製)；	
Bact-Soytone (Difco社製)；	
Yeast-Extract (Difco社製)；	

または

豆濃(大豆蛋白質の酸加水分解濃縮液)、

乳酸 0または1.4ml/L、

初発pH 5.0

の培地を用いて、上記フラスコ培養法に従ってメイン培養を2日間又は4日間行ない、乳酸の存在又は非存在下でのセルロース蓄積量を評価した。

【0033】その結果を表1に示した。

【0034】

【表1】

10

20

30

表 1

有 機 N 源	セルロース蓄積量 (g/L)	
	培養 2 日後	培養 4 日後
Bact-Soytone	0. 27	0. 66
Bact-Soytone+乳酸	3. 04	3. 31
Yeast-Extract	0. 22	0. 86
Yeast-Extract+乳酸	2. 67	4. 13
Bact-Peptone	0. 14	0. 37
Bact-Peptone+乳酸	0. 82	1. 80
豆 濃	0. 24	0. 94
豆濃+乳酸	1. 37	4. 66

【0035】表1の結果から分かるように、培地に乳酸を添加するときには、無添加の場合と比較していずれの有機N源においてもセルロース蓄積量が約5倍～約12倍増大した。使用した有機N源によるセルロース蓄積量は、培養4日後でBact-Peptone<Bact-Soytone<Yeast-Extract<豆濃の順に増大した。

【0036】実施例2 乳酸以外のカルボン酸添加効果

*有機窒素源としてBact-Soytoneを、またカルボン酸として乳酸の他に酢酸及びビルビン酸を10mmol/L添加又は無添加で用いた以外は、実施例1と同様に培養して、セルロース蓄積量に及ぼす乳酸以外のカルボン酸の添加効果を調べた。

【0037】その結果を表2に示した。

【0038】

【表2】

表 2

カルボン酸	セルロース蓄積量 (g/L)	
	培養 2 日後	培養 4 日後
無 添 加	0. 27	0. 68
酢 酸	1. 00	1. 50
ビルビン酸	1. 51	2. 16
乳 酸	1. 66	3. 23

【0039】表2から、カルボン酸として酢酸及びビルビン酸を使用したときにも、セルロース蓄積量は無添加の場合と比べて約2倍～約6倍増大することが判明した。培養4日後で評価すると、セルロース蓄積量の程度は、酢酸<ビルビン酸<乳酸の順に増大した。

【0040】実施例3 セルロース蓄積量に及ぼすカルボン酸添加量の影響

有機窒素源としてBact-Soytoneを、また乳※

※酸を0.1ml/L、0.5ml/L、1.0ml/L、5.0ml/L、10.0ml/L、15.0ml/Lの添加量で用いた以外は、実施例1と同様に4日間培養してそれぞれの添加量におけるセルロース蓄積量を評価した。

【0041】その結果を表3に示す。

【0042】

【表3】

表 3

乳酸添加量 (ml/L)	0	0.1	0.5	1.0	5.0	10.0	15.0
セルロース蓄積量 (g/L)	0.75	1.5	1.8	3.5	4.5	6.0	5.2

【0043】表3の結果は、乳酸添加量0.1ml/Lから10.0ml/Lまではセルロース蓄積量が漸増するが、さらに乳酸添加量を増量してもセルロース蓄積量が逆に減少する傾向を示している。

【0044】実施例4 セルロース蓄積量に及ぼす菌株の影響

セルロース生産性酢酸菌としてアセトバクター・スピーシーズBPR2001株の他にアセトバクター・キシリ*

表 4

菌 株	セルロース蓄積量 (g/L)	
	乳酸無添加	乳酸添加
アセトバクター・スピーシーズ BPR2001株	0.76	3.36
ATCC23768	0.17	1.20
ATCC23769	0.79	2.09

【0047】表4の結果から、使用された3種の菌株間で実質的なセルロース蓄積量は異なるけれども、いずれの菌株においても乳酸添加によりセルロース蓄積量が約2.5倍〜約7倍に増加した。特に、アセトバクター・スピーシーズBPR2001株及びアセトバクター・キシリナムATCC23769が高いセルロース産生を示した。

【0048】実施例5 セルロース生産性酢酸菌のジャーファメンター培養

セルロース生産性酢酸菌としてアセトバクター・スピーシーズBPR2001株を、また検討培地として下記組成：

フラクトース 40g/L、

表 5

乳酸の有無	セルロース蓄積量 (g/L)	
	培養20時間	培養30時間
無	2.1	4.5
有	5.0	7.0

【0051】表5の結果は、ジャーファメンターを使用★50★してpH、溶存酸素量等の発酵条件を制御するときに

10*ナムATCC23768及びアセトバクター・キシリナムATCC23769を、また有機窒素源としてBact-Soytoneを用いた以外は実施例1と同様の方法で4日間培養を行ない、各菌株についてセルロース蓄積量を測定した。

【0045】その結果を表4に示した。

【0046】

【表4】

※KH₂PO₄ 1.0g/L、
MgSO₄ 0.3g/L、
(NH₄)₂SO₄ 3g/L、
Bact-Soytone 5g/L、
乳酸 0又は1.4ml/L、
初発pH 5.0
の培地を用いて、上記ジャーファメンター培養法に従ってメイン培養を20時間又は30時間行ない、乳酸の存在又は非存在下でのセルロース蓄積量を評価した。

【0049】その結果を表5に示す。

【0050】

【表5】